

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年12 月12 日 (12.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/099102 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 5/10, C12P 21/02, A61K 31/711, 38/16, 48/00, A61P 25/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10231

(22) 国際出願日: 2001 年11 月22 日 (22.11.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-164412 2001 年5 月31 日 (31.05.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4-1-8 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今井貴雄 (IMAI, Takao) [JP/JP]. 徳永暁憲 (TOKUNAGA, Akinori) [JP/JP]. 吉田 哲 (YOSHIDA, Tetsu) [JP/JP]. 岡野栄之 (OKANO, Hideyuki) [JP/JP]; 〒160-0016 東京都新宿区信濃町35 慶応義塾大学医学部生理学教室内 Tokyo (JP). 御子柴克彦 (MIKOSHIBA, Katsuhiko) [JP/JP]; 〒108-0071 東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所脳神経発生・分化分野内 Tokyo (JP). 中福雅人 (NAKAFUKU, Masato) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大学院医学系研究科神経生物学講座内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

[続葉有]

(54) Title: NUMB PROTEIN EXPRESSION INHIBITORS BY MUSASHI

(54) 発明の名称: MusashiによるNumbタンパク質発現抑制剤

(57) Abstract: Numb protein expression inhibitors, Notch information transfer activity enhancers and nerve stem cell proliferation activity enhancers which comprise as the active ingredient a Musashi protein, polypeptides having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of the Musashi protein by substitution, deletion, addition or insertion of one or more amino acids or genes encoding these polypeptides. Thus, novel functions of the Musashi protein have been clarified. Namely, the Musashi protein inhibits the expression of the Numb protein capable of controlling neuron differentiation and enhances the activity of the Notch information transfer system, which makes it usable as remedies for various central nerve diseases.

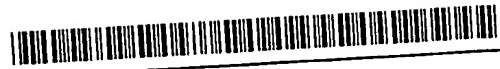
(57) 要約:

ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分とするNumbタンパク質発現抑制剤、Notch情報伝達活性増強剤、及び神経幹細胞増殖活性増強剤。

本発明によりムサシ蛋白質の新たな機能が解明された。すなわち、ムサシ蛋白質はニューロン分化調節機能を有するNumbタンパク質の発現を抑制し、またNotch情報伝達系の活性を増強するので各種中枢神経疾患の治療薬として利用できる。

WO 02/099102 A1

WO 02/099102 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

Musashi による Numb タンパク質発現抑制剤

技術分野

本発明はニューロン分化調節機能や Notch 拮抗作用を有する Numb タンパク質の発現を抑制し、Notch 情報伝達系の異常に基づく疾患の治療薬として有用な医薬及び神経幹細胞増殖活性増強剤に関する。

背景技術

Numb タンパク質 (Wakamatsu et al., Neuron 23(1999):71-81) は哺乳類中枢神経細胞幹細胞の自己複製活動に必要な Notch タンパク質のシグナル伝達カスケードを阻害することが知られている (Ohtsuka et al., EMBO J.18(1999):2196-2207 及び Nakamura et al., J. Neurosci.20(2000):283-293)。

そして Notch タンパク質を介した情報伝達系は、神経幹細胞の自己複製および／又は生存等に関与している (Artavanis-Tsakanos et al., Science, 268(1999): 770-776)。

発明の開示

本発明者は、哺乳類の中枢神経系の幹細胞に強く発現することが知られているムサシ蛋白質 (Musashi) に着目し、その機能について検討してきたところ、ムサシ蛋白質が Numb タンパク質の発現を翻訳段階で抑制すること、さらに Notch 情報伝達の活性を増強する作用を有し、Notch 情報伝達活性の異常に基づく疾患の治療薬として有用であることを見出した。また、本発明者はムサシ蛋白質の機能を検討する目的でムサシ蛋白質遺伝子を欠損させた動物を用いて検討したところ、ムサシ蛋白質が神経幹細胞の増殖活性を増強することを見出し、本発

明を完成するに至った。

すなわち、本発明はムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分とする Numb タンパク質発現抑制剤を提供するものである。

また本発明はムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分とする Notch 情報伝達活性増強剤を提供するものである。

また、本発明は、ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分とする神経幹細胞増殖活性増強剤を提供するものである。

また、本発明はムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の有効量を適用することを特徴とする Numb タンパク質発現の抑制方法を提供するものである。

また本発明はムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の有効量を適用することを特徴とする Notch 情報伝達活性の増強方法を提供するものである。

また、本発明は、ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の有効量を適用することを特徴とする神経幹細胞増殖活性の増強方法を提供するものである。

すなわち、本発明はムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数

個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の Numb タンパク質発現抑制剤製造のための使用を提供するものである。

また本発明はムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の 1 又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の Notch 情報伝達活性増強剤製造のための使用を提供するものである。

また、本発明は、ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の 1 又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の神経幹細胞増殖活性増強剤製造のための使用を提供するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、完全長 Msi1 タンパク質と細菌で発現させた融合 Msi1 タンパク質 Msi1-2TR (Msi1 が結合する至適 RNA 配列の選択に使用したもの) のドメイン構造の略図である。

図 2 は、Msi1-2TR タンパク質と結合 RNA の結合を示す図である。

図 3 は、各選択過程において、用いた総 RNA 中における結合 RNA の割合を放射能活性を指標に示した図である。

図 4 は、Msi1 選択による RNA の配列を示す図である。

図 5 は、Msi1 で選択された RNA 配列の代表的な二次構造を示す図である。(影をつけた部分が選択配列を示す。)

図 6 は、Msi1 タンパク質のゲルシフト法による分析 (A) [0 fmol (レーン 1, 6, 11)、1 fmol (レーン 2, 7, 12)、10 fmol (レーン 3, 8, 13)、100 fmol (レーン 4, 9, 14)、1000 fmol (レーン 5, 10, 15)] 及び非標識 RNA を用いた競合 RNA 結合試験 (B) [4fmol の標識 RNA を単独で (レーン 16, 21, 26, 31)、また、10 fmol

の Msi1-2TR タンパク質および、0 fmol (レーン 17, 22, 27, 32)、40 fmol (レーン 18, 23, 28, 33)、400 fmol (レーン 19, 24, 29, 34)、4000 fmol (レーン 20, 25, 30, 35) の非標識 RNA とともに保温] を示す。

図 7 は、numb 遺伝子の構造を示す図である。(矢印は (N1, N2, N3) は、in vitro で個別に転写される領域を示す。縦方向の楔印は、Msi1 結合配列と考えられる配列 (UAGGUAGUAGUUUA) を含む領域を示す。

図 8 は、m-numb 遺伝子の mRNA の 3'-UTR に由来するさまざまな転写産物に対する Msi1 タンパク質との結合試験を示す。N1 と N3 は、m-numb 遺伝子の RNA。(-) はビオチンで標識した RNA を含まないレーン。右側の写真の長方形の部分は、1 回の試験で使用した総タンパク質量を示す。

図 9 は、Msi1 融合タンパク質の略図である。F は完全長のマウス Msi1 を、R は RNA 結合ドメインが 2 個並列した領域を含む短縮型タンパク質 (Msi1-2TR) を、C はマウス Msi1 の C 末端部分を含む短縮型タンパク質を示す。

図 10 は、完全長の Msi1 タンパク質 (F) 及び短縮型 Msi1-2TR タンパク質 (R、SELEX に使用) と、選択 Msi1 結合配列を含む N2RNA との結合を示す図である。

図 11 は、Msi1 タンパク質 FLAG-Msi1-HAT (H)、FLAG-Msi1mutR1-HAT (A) および FLAG-Msi1 (F) の略図である。C 末端にある HAT タグは、Talon 樹脂 (Clontech) に結合させるためのアフィニティタグである。FLAG-Msi1mutR1-HAT は、N 末端の RNA 結合ドメインのアミノ酸を置換した Msi1 の非 RNA 結合型である。

図 12 は、NIH 3T3 細胞における Msi1 タンパク質 H、A、F の発現と、HAT タグを介したアフィニティー沈殿を、抗 FLAG モノクローナル抗体を用いたイムノブロットで分析した結果を示す図である。

図 13 は、RT-PCR とアフィニティー沈殿法を組み合わせた in vivo RNA 結合試験を示す図である。RT (-) のレーンは、RT-PCR が RNA 依存性であることを確認する際の対照。右のパネルは、アフィニティー樹脂と混合共存させる前の初

期抽出物に由来する RT 産物を用いたプライマーの忠実度を確認するための増幅対照試験。レーン H=FLAG-Msi1-HAT、レーン F=FLAG-Msi1、レーン A=FLAG-Msi1mutR1-HAT。

図 1 4 は、組換えアデノウイルスによる Msi1 の異所的過剰発現、m-Numb タンパク質のイムノブロットによる分析およびノーザンブロットによる分析を示す図である。

図 1 5 は、m-Numb タンパク質（白いバー）と m-numb 遺伝子の mRNA（黒いバー）の相対量を示す図である。

図 1 6 は、Msi1 エフェクターと m-numb 遺伝子の 3'-UTR を含むおよびレポーターの略図である。α=pcDNA3-T7msi1、β=pcDNA3-T7msi1mutR1（αとβは CMV のプロモーターの制御下においた）。a=pGVP2-numb3'-UTR、b=pGV-p2、c=pGVP2-reversed numb3'-UTR（a, b, c は、SV40 のプロモーターの制御下においた）。

図 1 7 は、ルシフェラーゼレポーターアッセイを示す図である。

図 1 8 は、ノーザン ELISA 法で定量したレポーター mRNA の相対レベルを示す。mRNA 上に Msi1 結合部位がない EGFP の転写産物の mRNA レベルを内部対照として用いた。キメラ mRNA 量と EGFP mRNA 量の比（対照に対する%）（3 回の独立した実験の平均と平均の標準誤差）で示した。

図 1 9 は、NIH 3T3 細胞の細胞質分画中のリボソーム粒子を含む Msi1 タンパク質のショ糖密度勾配プロファイルを示す。曲線は、各画分の A₂₅₄ と 40S、60S、80S のリボソーム粒子およびポリソームの位置を示す。下のパネルは、抗 FLAG モノクローナル抗体を用いた FLAG-Msi1 タンパク質の免疫検出法による分析の結果を示す。

図 2 0 は、Msi1 発現と Notch1 による HES1 プロモーターの活性化との関係を示す。

図 2 1 は、Numb 過剰発現と Notch1 による HES1 プロモーターの活性化との関係を示す。

図 2 2 は、msi2 asPNA の存在下(+)および非存在下(-)における msi2 および対照 g3pdh mRNA の判定的 RT-PCR 分析結果を示す図である。

図 2 3 は、Msi2 タンパク質発現に対して msi2 asPNA が及ぼす作用、Msi2 抗体に関する免疫細胞化学的シグナルで視覚化した図である。

図 2 4 は、msi2 asPNA の存在下における msi1^{-/-}および野生型同腹仔に由来するニューロスフェアの数の比較を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の医薬の有効成分であるムサシ蛋白質は、哺乳類の中枢神経系幹細胞で強く発現する RNA 結合タンパクである。そして、ムサシ蛋白質にはムサシ 1 (Musashi1 又は Msi1) 及びムサシ 2 (Musashi2 又は Msi2) の 2 つがあることが知られている (Sakakibara, S. et al., Dev. Biol. 176(1996):230-242)。これらのムサシ蛋白質のうち、ムサシ 1 (Msi1) (配列番号 17) が特に好ましい。

これらのムサシ蛋白質は、それが存在する細胞から分離することもできるが、ムサシ蛋白質をコードする遺伝子がすでにクローニングされているので、DNA 組み換え技術、すなわち、当該遺伝子を用いて調製した発現ベクターを利用し、形質転換した細胞を用いて調製してもよい。

またムサシ蛋白質は、神経幹細胞で発現している蛋白質そのものでもよいが、同様の性質を有する限り、その一部のアミノ酸配列が改変されたものでもよい。例えばムサシ蛋白質のアミノ酸配列の 1 又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも使用し得る。これらの置換、欠失、付加もしくは挿入の程度及びそれらの位置は、改変されたアミノ酸配列がムサシ蛋白質と同様の性質を有するものであれば特に制限されない。これらの改変ポリペプチドもまた、ムサシ蛋白質同様に DNA 組み換え技術により調製できる。

また、ムサシ蛋白質又は上記改変ポリペプチドをコードする遺伝子を投与し、体内で当該蛋白質又は改変ポリペプチドを生成させてもよい。

後記実施例に示すようにムサシ蛋白質は、哺乳類の numb 遺伝子の mRNA と結合し、numb 遺伝子の発現を翻訳段階で調節し、Numb タンパク質の発現を抑制する。

また、ムサシ蛋白質の発現によって、Numb タンパク質の発現が抑制される結果、Notch 情報伝達の活性が増強される。従って、ムサシ蛋白質は、Notch 情報伝達系の異常に基づく疾患、すなわち神経幹細胞の自己複製および／又は生存不全の治療薬として有用である。

また、Msi1 遺伝子欠損マウス由来の神経幹細胞において、Msi2 遺伝子の発現を減弱させると、ニューロスフェア形成能が著しく減少することから、ムサシ蛋白質は神経幹細胞の増殖活性を増強させる。

本発明において、ムサシ蛋白質又はその遺伝子を適用する対象としては、細胞、組織及びヒトを含む動物のいずれでもよい。

本発明の医薬をヒトを含む動物、特に哺乳類に投与するには、前記有効成分に薬学的に許容される担体を加えて、種々の投与形態の医薬組成物とすることができ、かかる投与形態としては注射用製剤が好ましい。また薬学的に許容される担体としては、蒸留水、溶解補助剤、安定化剤、乳化剤、緩衝剤等が挙げられる。また、これら医薬の投与量は、疾患、性別、体重等により変化するが、ムサシ蛋白質量として $0.1 \mu\text{g} \sim 10\text{mg}$ / 日程度であろう。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるものではない。

実施例 1

A. 材料と方法

(1) Msi1 融合タンパク質の調製

マウスの Msi1 融合タンパク質 (Msi1-2TR) を調製するために、musashi-1

cDNA のコード領域の一部（アミノ酸残基 7～192 に相当）を pET21a 発現ベクター（Novagene）に挿入し、プラスミドベクター pET21a-msi12TR を構築した。このプラスミドは大腸菌 BL21（DE3）/pLysS に導入して増幅した。融合タンパク質の発現とアフィニティ精製は文献の方法で行った（Kaneko et al., Dev. Neurosci. 22(2000):138-152）。

（２）MsiI のリガンドである RNA の選択

RNA の選択は、基本的に文献の方法で行った（Buckanovich et al., Mol. Cell. Biol., 17(1997):1197-1204、Tsai et al., Nucleic Acids Res. 19(1991):4931-4936）。プライマー結合部位の間に 50bp のランダム配列をはさむオリゴヌクレオチド（5'-GGGAAGATCTCGACCAGAAG-N₅₀-TATGTGCGTCTACATGGATCCTCA-3'）を DNA 合成装置（Nissinbo）で合成した。このオリゴヌクレオチドは、T7 プロモーター配列を含むフォワードプライマー（5'-CGGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCTCGACCAGAAG-3'）とリバースプライマー（5'-TGAGGATCCATGTAGACGCACATA-3'）を用いて PCR 法で増幅した。ライブラリー DNA は、T7RNA ポリメラーゼと [α -³²P] UTP（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて in vitro で転写した。得られた RNA は、ニッケルアフィニティ樹脂を充填したカラムに添加した。このカラムにはあらかじめ 100 μ g のヒスチジントグをもつ精製 MsiI 融合タンパク質を吸収させておいた。binding buffer には 0.5M LiCl, 20mM Tris-HCl [pH7.5], 1mM MgCl₂ を用いた。次にビーズを 10 ml の binding buffer で洗浄し、結合 RNA は elution buffer（20mM Tris-HCl [pH7.5], 1M イミダゾール）でカラムから溶出し、フェノールで抽出してエタノールで沈殿させた。この RNA をモロニーマウス白血病ウイルスの逆転写酵素（Gibco BRL）で逆転写して得られた cDNA を PCR に用いた。上記のフォワードおよびリバースのプライマーを用いて、94℃1 分間、59℃1 分間、72℃1 分間を 15 サイクル行い DNA を増幅した。PCR 産物は次回の RNA 選択に用いた。以上の手順を、さらに 7 回繰り返して行ったあとに、増幅産物を pUC119 ベクター

(Clontech) にサブクローニングした。RNA の二次構造は、市販の配列解析ソフトウェア DNASIS (Hitachi Software Engineering Inc.) のプログラムを使用し、Zuker-Stiegler 法で予測した。

(3) ゲルシフト法

ゲルシフト法は、MsiI 融合タンパク質の量を変えて 16 μ l の KNET 緩衝液を用いて行った (Levine et al., Mol. Cell. Biol., 13(1993):3494-3504)。1 分あたり 1 万カウント (約 4 fmol) の 32 P 標識選択 RNA リガンド (S8-13 と S8-19) を、MsiI 融合タンパク質を含む溶液に加えた。競合試験の場合は未標識 RNA を 32 P 標識 RNA 添加前に加えた。タンパク質と RNA のサンプルは、室温に 30 分静置して平衡化させた。保温後に混合液を 8% または 15% のポリアクリルアミドゲル (0.5 \times Tris-ホウ酸-EDTA 緩衝液、5% グリセロール) に直ちに添加して電気泳動で分離した。ゲルを乾燥して XAR オートラジオグラフィフィルムを感光させた (Kodak)。

(4) m-numb 遺伝子の 3' UTR を用いた in vitro 結合試験

[35 S] メチオニン標識した完全長の MsiI タンパク質を、プラスミドベクター pRSETb-msi1 (Sakakibara et al., Dev. Biol., 176(1996):230-242)、pET21a-msi12TR、pRSETb-C17 (C 末端半分)、T7RNA ポリメラーゼを含む網状赤血球溶解液 (Promega) を用いて in vitro 転写翻訳系で調製した。MsiI タンパク質は、ビオチン-14-CTP で標識した m-numb RNA とともに binding buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH8.0], 0.05% NP-40, 0.1% アジ化ナトリウム) 中で 30 分間保温した。次に MsiI と m-numb RNA の混合液を、あらかじめ binding buffer に再懸濁しておいたストレプトアビジン-アガロースビーズに添加した。ビーズは 1ml の binding buffer で 5 回洗浄した。ビーズペレットを、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE 用) 添加液に再懸濁し、5 分間沸騰後に遠心した。上清を 15% SDS ポリアクリルアミドゲルに添加して電気泳動で分離した。電気泳動後にゲルを乾燥させ、Fuji RX-U フィルムを -80°C

で 1.5～8 時間感光させた。

(5) 細胞培養と in vivo 結合試験

NIH 3T3 細胞は、10% 子ウシ血清を加えたダルベッコ改変イーグル培地 (Nissui) を用いて培養した。培養には 60 mm のシャーレ (Falcon) を用いた (10⁶ 細胞/シャーレ)。翌日、図 11 の通りに 1 μ g の Msi1 発現構成体 (pcDNA3-FLAGMsi1HAT, pcDNA3-FLAGMsi1mutR1HAT, pcDNA3-FLAGMsi1) を、Effective transfection reagent (Qiagen) を用いて細胞に導入した。2 日後に導入細胞を 1 ml の NET-Triton 緩衝液に懸濁し、ホモジナイズして微量遠心機で遠心した。RNase 阻害剤 (Promega) の存在下 (0.5U/ μ l)、上清に含まれるヒスチジンアフィニティタグ (HAT) をつけた Msi1-RNA 複合体を、Talon 樹脂 (Clontech) と共沈させた。沈殿した RNA の抽出、DNaseI による処理、逆転写は文献の方法で行った (Bacckanovich et al., Mol. Cell. Biol., 17(1999):3194-3201)。続いて m-numb 遺伝子に特異的なプライマー (5'-ATGAGCAAGCAGTGTTCCTGG-3' と 5'-CAAGTAGCTGCAACTGGCTGG-3') を用いて、94℃30 秒、60℃30 秒、72℃30 秒の 32 サイクルの条件で、また、 β -アクチンに特異的なプライマー (5'-CTTCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGAGC-3' と 5'-GCCTAGAAGCACTTGCGGTGCACG-3') を用いて、94℃30 秒、60℃30 秒、72℃30 秒の 25 サイクルの条件で PCR を行った。

(6) ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイと、ノーザン ELISA 系によるレポーター mRNA の定量

NIH 3T3 細胞 (1 回の試験につき 3 \times 10⁵ 細胞/ml) を、0.2 μ g のホタルルシフェラーゼレポーターベクター、20ng の対照用ウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼベクター pRL-TK (Toyo Ink)、0.3 μ g の pEGEP-N3 ベクター (Clontech) とともに、pcDNA3 ベクター (Invitrogen) と pcDNA3-T7Msi1 または pcDNA3-T7Msi1mutR1 発現ベクターを組み合わせ (全体として 1.5 μ g)、Fugene 6 transfection reagent (Roche) を用いて導入した。2 日間保温した後に細胞をルシフェラーゼレポーターアッセイ用 lysis buffer (Toyo Ink) に溶解した。

ホタルルシフェラーゼ（レポーター）活性と Renilla ルシフェラーゼ活性（対照）は、メーカーから入手した反応基質混合液中で、Berthold Lumat LB9507 ルミノメーターで測定した。相対発光量で表したレポーターのルシフェラーゼ活性を、対照となる Renilla ルシフェラーゼ活性で割った比を元にレポーターのルシフェラーゼ値を標準化した。

NIH 3T3 細胞は、上述のレポーターアッセイで導入・培養した。2 日後に細胞を回収して、Trizol 試薬（Gibco BRL）を用いて総 RNA を抽出した。DNaseI 処理後、各 2 μ g の RNA を用いて、レポータールシフェラーゼ RNA の定量と、対照としてエンハンスド緑色蛍光タンパク質（EGFP）RNA の定量を、ノーザン酵素結合免疫吸着検定（ELISA）システム（Rosh Diagnostics）で行った。ジゴキシゲニン標識検出用プローブの調製には、基質としてジゴキシゲニン-11-2'-デオキシウリジン-三リン酸を、また鋳型として 10ng のプラスミド DNA（pGV-P2; Promega, pEGFP-N3; Clontech）を用いた PCR を行った。条件は、94℃ 30 秒、52℃ 30 秒、72℃ 30 秒の 25 回のサイクル（最終伸張反応を 2 分間）とし、Ex Taq DNA ポリメラーゼ（Takara）、ルシフェラーゼ遺伝子特異的プライマーおよび EGFP 特異的プライマーを用いた。ルシフェラーゼ遺伝子のフォワードプライマーは 5'-GAGGTCCTATGATTATGTCCGG-3'、リバープライマーは 5'-GTTGGAGCAAGATGGATTCC-3' とし、EGFP のフォワードプライマーは 5'-CAGAAGAACGGCATCAAGG-3'、リバープライマーは 5'-TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG-3' とした。NIH 3T3 細胞中におけるルシフェラーゼ-m-numb 3'-UTR キメラ mRNA と対照 EGFP mRNA の発現レベルは、ペルオキシダーゼと 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを用いて測光強度（450nm の吸光値）から決定した。

（7）組換えアデノウイルスの調製と感染実験

pAdex1pCAw ベクターを元に組換えアデノウイルス Adex-FLAGMsi1 を調製した。手順はほぼ文献通りにしたがった（Hasimoto et al., Hum. Gene Ther. 7(1996):149-158）。高力価の組換えアデノウイルス株（Adex-FLAGMsi1, $3 \times$

10^{10} PUF/ml; Adex-NLLacZ, 3×10^{10} PUF/ml) を入手して -80°C で保管した。

NIH 3T3 細胞 (2.5×10^6 細胞) に、1000 倍希釈したアデノウイルス溶液を、5%のウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 5 ml 中で感染させた。2 日後に lysis buffer (Buckanovich et al., Mol. Cell. Biol., 17(1999):3194-3201) で細胞を溶解し、ウェスタンブロットによる解析を文献の方法で行い (Kaneko et al., Dev. Neurosci., 22(2000):138-152)、続けてノーザンブロットとショ糖密度勾配遠心法による分析を行った。マウスとニワトリのタンパク質でエピトープとして完全に保存されているアミノ酸配列を認識するウサギの対ニワトリ Numb ポリクローナル抗体 (Wakamatsu et al., Neuron 23(1999):71-81) (アフィニティ精製)、抗 FLAG-M2 マウスモノクローナル抗体 (Sigma)、抗チューブリンマウスモノクローナル抗体 (Sigma クローン番号 1A2) は、それぞれ 1:500、1:1000、1:1000 に希釈して、リン酸緩衝食塩水で 3%に希釈したスキムミルク中でイムノブロットを行った。それぞれの免疫反応性はジアミノベンジジンで検出した。シグナルは NIH Image プログラム (version 1.62, NIH) で定量した。

(8) ノーザンブロットによる RNA の定量

総 RNA は、Trizol 試薬 (Gibco BRL) を用いて、上記の方法で Adex-FLAGMsi1 を感染させた NIH 3T3 細胞から抽出してエタノールで沈殿させた。この RNA を、モルホリノプロパンスルホン酸-ホルムアルデヒド-アガロースゲルで泳動した後、Hybond N+ナイロンメンブレン (Amersham Pharmacia Biotech) に移し、 ^{32}P 標識 m-numb cDNA と β アクチンの cDNA をプローブとしてハイブリッドを形成させた。ハイブリッド形成シグナルは、XAR オートラジオグラフィー用フィルム (Kodak) で検出し、BAS5000 (Fuji) で定量した。 β アクチン mRNA のハイブリッド形成シグナルに対する m-numb 遺伝子の mRNA のシグナルの比を算出し、m-numb 遺伝子の mRNA レベルの標準量とした。2 回の独立した実験を行って平均値を算出した。

(9) ショ糖密度勾配遠心法

ショ糖密度勾配遠心法は文献の方法で行った (Siomi et al., Mol. Cell. Biol., 16(1996):3825-3832)。Adex-FLAGMsi1 を上述の方法で感染させた NIH 3T3 細胞を遠心して回収し、冷リン酸緩衝食塩水で洗浄し、緩衝液 A (10mM 酢酸カリウム、2mM 酢酸マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、5mM HEPES [pH7.3]、2 μ g/ml ロイペプチン、2 μ g/ml ペプスタチン、0.5%アプロチニン) に再懸濁して氷中に 10 分間静置した。ニードルを通して細胞を破碎し、2500g で 10 分間遠心してペレットと上清を得た。後者を細胞質溶解液と命名した。KCl 濃度は、この時点で 100mM に調節した。細胞質溶解液は、100mM KCl、10mM 酢酸カリウム、2mM 酢酸マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、5mM HEPES [pH7.3]、1ml あたり 2 μ g のロイペプチン、1ml あたり 2 μ g のペプスタチン、0.5%のアプロチニンを含む直線型ショ糖密度勾配 (5~30%) 溶液に溶解した。この溶液を Hitachi P40St1286 ローターに据えて、40000rpm で 150 分間 4℃で遠心した。遠心後、ピストン・グラジエント・フラクショネーター (Biocomp, Inc.) を用いて、画分を勾配の最上部から回収した (1 画分あたり 300 μ l)。一画分について 30 μ l をウェスタンブロット法による分析に用いた。RNA をフェノールを用いて画分から抽出し、エタノールで沈殿させた後に A_{254} を測定した。

(10) HES1 プロモータのトランス活性化試験

HES1 プロモータ活性を測定するために、0.2 μ g の pHES1p-ルシフェラーゼ (Jarriault et al., Nature, 377(1995):355-358) 単独、これに 0.025 μ g の pEF-BOS-FCDN1 (Notch1 細胞内領域発現プラスミド [FCDN1, aa1747~2531]) (Nofziger et al., Development, 126(1999):1689-1702) を加えたもの、または、pcDNA3-T7Msi1 と pEF-BOSneo-R218H (Kato et al., Development, 124(1997):4133-4141) をさまざまな量で組み合わせたもの、または、1 μ g の pcDNA3-HAMNumb を量を変えて組み合わせたものを NIH 3T3 細胞に導入した。この際、100ng の SV40-LacZ 融合遺伝子または 20ng の対照用 Renilla ルシフェラ

ーゼベクターpRL-TK (Toyo Ink) を、個々の導入様式について内部標準として用いた。独立した実験を 3 回行った。ルシフェラーゼ活性は導入してから 48 時間後にルミノメーターLumat LB9507 (Berthold) で測定し、 β ガラクトシダーゼ活性または Renilla ルシフェラーゼ活性に対して標準化した。

B. 結果

(1) Msi1 に対する高親和性 RNA リガンドの *in vitro* 選択

Msi1 の標的となる RNA 配列を特定するために、アフィニティ溶出に基づく RNA 選択 (SELEX) を行った。³²P 標識した RNA プールを、50 ヌクレオチドの不完全なランダム配列を鋳型とした PCR で増幅したオリゴヌクレオチドライブラリを用いて *in vitro* で合成した。合成した RNA プールを、あらかじめ Msi1 融合タンパク質 Msi1-2TR を吸収させておいたニッケル製アフィニティカラムに添加した。Msi1-2TR には、2 か所のタンデム RRM 型 (Burd et al., EMBO J., 13(1994):1197-1204) RNA 結合ドメイン (RBD) (aa17~192) のほかに、C 末端にヒスチジンタグが、また、N 末端に T7 タグを含む (図 1)。洗浄して Msi1-2TR 融合タンパク質と結合しなかった RNA を除去した後に、Msi1-2TR 融合タンパク質-RNA 複合体を、1M イミダゾールを含む緩衝液中に溶出した。初回選択の溶出プロファイルを図 1B に示す。RNA とタンパク質の溶出は、放射能をカウントして、また SDS-PAGE を行ってそれぞれモニタリングした (図 2)。結合した RNA を各サイクル後に抽出し、SELEX 用リバースプライマーを用いて逆転写後に最初の cDNA 鎖を得た。選択された RNA 配列をコードする cDNA は PCR で増幅して、次の結合サイクルおよび増幅用の RNA 合成の鋳型として再び用いた。アフィニティ RNA-リガンド選択を繰り返すことで、Msi1 に結合する RNA 画分が初期 RNA プールにおける 0.2% から、8 回の選択サイクル後には 60% まで上昇することが明らかとなった (図 3)。以上の手順で、Msi1 と強く結合する RNA 配列が高濃度に含まれる RNA プールを得た。

次に、8 回の選択サイクルで得た独立した 50 個の cDNA クローンの配列を決定

し、その情報を元に Msi1 が結合する RNA コンセンサス配列を特定した (図 4)。20 個の代表的なクローンを図 4 に示す。いずれのクローンにも A または AG をはさむ 1~6 塩基の短い U の連続がみられた。ここに示していない他の 30 個のクローンについても、同じコンセンサス対応配列がみられ、一部は重複しており、図 4 に挙げたクローンの一部と同じ RNA 配列が認められた。選択クローンの大半には、特に (G/A) U_nAGU モチーフが認められた (図 4 の下線部; 多くの場合 n は 1~3)。ウリジンに富む配列は 2~3 回繰り返すことが多かった。U の出現回数 (n) は、n=1 が 31%、n=2 が 40%、n=3 が 21%、n=4 が 5%、n=5 が 2% であった。興味深いことに配列は多くの場合、ステムループ構造のループ領域内にみられた (図 5)。これは、Zuker-Stiegler 法に基づく市販の配列解析ソフトウェア (DNasis, Hitachi Software Engineering Inc) で予測した。

(2) RNA-タンパク質結合試験

反復 (G/A) U_nAGU モチーフが、Msi1-RNA 相互作用に不可欠な配列であることを詳しく調べるために、Msi1-2TR 融合タンパク質と、最も多く選択されたクローン—選択コンセンサスモチーフに対応する配列をそれぞれ 2 個または 3 個含む S8-13 と S8-19 (図 6A) —の RNA 配列を用いて結合試験を行った。4 fmol の標識 RNA と、さまざまな量の Msi1-2TR タンパク質を保温してゲルシフト法で解析した。各試験で認められた遅延バンドの数は、選択クローンにみられるコンセンサス配列モチーフ (G/A) U_nAGU と対応する配列数と一致した。S8-13 RNA には 2 つのコンセンサスモチーフがあり、S8-19RNA には 3 つのモチーフがある。Msi1 タンパク質は、選択コンセンサス配列を含まない NC-4 と命名した RNA は認識しなかった (図 6A)。Msi1 タンパク質が選択 RNA に特異的に結合するか否かを調べるために、Msi1 選択コンセンサス配列、または、完全なコンセンサス配列のない非特異的競合配列を含む未標識 RNA を用いて競合結合試験を行った (図 6B)。4fmol の ³²P 標識 RNA (S8-13 または S8-19) を 100fmol の Msi1 タンパク質と 10、100、1000 倍過剰量の非標識 RNA と保温後にゲルシフト法で解析した (それぞれ

図 6B のレーン 13~15、レーン 18~20、レーン 23~25、レーン 28~30 に対応)。タンパク質-RNA 複合体を示す遅延バンドの強度は、競合配列として Msi1 認識配列（標識 RNA と同じ配列）を含む過剰な未標識 RNA を加えることで減衰した。しかしこの強度は、Msi1 認識配列（NC-4）を含まない RNA を添加しても減衰した。以上の結果から、Msi1 タンパク質が *in vitro* で選択したコンセンサス配列に対応した配列を含む RNA を特異的に認識することがわかった。Msi1 に対する選択 RNA 配列の結合親和性は、ゲルシフト法における RNA-Msi1 複合体を示す遅延バンドの強度から決定した。解離定数 K_d は、RNA の 50% が結合するタンパク質濃度に等しい。図 6A のレーン 4 とレーン 9 では、RNA の 50% がタンパク質と結合していることがデンストメトリーによる評価から明らかとなった。 K_d は S8-13 と S8-19 について約 4nM と算出された。したがって Msi1 は、高い親和性でコンセンサス配列モチーフと対応する配列を含む RNA と結合することがわかった。

(3) *in vitro* および *in vivo* における、Msi1 は m-numb 遺伝子の mRNA との結合

Msi1 タンパク質に対する下流標的遺伝子群の候補を、*in vitro* 選択試験結果を元に探索した。Msi1 は未分化のニューロン前駆細胞で強く発現するので、神経分化を（正または負に）調節する遺伝子群の mRNA が Msi1 の標的の下流にある可能性が高い。Notch 拮抗物質をコードする m-numb 遺伝子は、以下に挙げる事実から Msi1 標的遺伝子の候補と言える。第一に、m-numb 遺伝子の mRNA の 3' 未翻訳領域（UTR）には、Msi1 結合のコンセンサス配列モチーフが含まれる。第二に、m-numb 遺伝子が発現する領域は、神経管の脳室帯の神経上皮細胞で msi1 遺伝子が発現する領域と重複する。第三に、m-numb はニューロン分化の調節に関与する。

Msi1 が *in vitro* で m-numb 遺伝子の mRNA の 3'-UTR と結合するか否かについて調べた。この目的のため、m-numb 遺伝子の mRNA の各部分（N1, N2, N3）を、ピオチン-14 CTP の存在下で *in vitro* で合成した（図 7）。Msi1 結合部位は N2 内

にあると考えられた。完全長の Msi1 タンパク質、Msi1 の 2 か所のタンデム RBD を含む短縮型タンパク質 (SELEX に使用した Msi1-2TR)、Msi1 の C 末端部分を含む短縮型タンパク質の 3 種を対象に、対 N2 結合能力を調べた (図 9 と 10)。完全長 Msi1 タンパク質と Msi1-2TR は、生理的環境に近い中程度のイオン強度 (150mM NaCl) で N2 と結合することがわかった (図 10)。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識した完全長の Msi1 タンパク質は、N2 と結合したビーズと共沈した一方で、m-numb の RNA の N1 と N3 部分は、完全長の Msi1 タンパク質との間で相互作用がみられなかった (図 8)。UV 架橋試験を行ったところ、Msi1-2TR が N2 のみと結合することが明らかとなり、完全長 Msi1 と、2 か所のタンデム RBD を含む短縮型タンパク質 (Msi-2TR) の両方が、in vitro において m-numb 遺伝子の mRNA の 3'-UTR 内で N2 領域と強く結合することを示していた。したがって m-numb 遺伝子の mRNA は、in vivo における Msi1 タンパク質の標的である可能性があることが判明した。

Msi1 が、numb 遺伝子の mRNA の 3'-UTR に in vivo で結合するか否かを判定するために、文献の方法を用いた (Buckanovich et al., Mol. Cell. Biol., 17(1997):3194-3201, Levine et al., Mol. Cell. Biol., 13(1993):349-3504, Steltz et al., Methods Enzymol., 180(1989):468-481)。一連の Msi1 発現ベクターをあらかじめ導入した NIH 3T3 細胞溶解液から Msi1-RNA 複合体を沈殿させた (図 11)。NIH 3T3 細胞では、m-numb 遺伝子は内在的に発現するが、Msi1 は発現しない。そこで、HAT タグをつけた Msi1 タンパク質 (図 12) —これは NIH 3T3 細胞内で Talon 金属キレート化アフィニティ樹脂 (Clontech) と極めて選択的に結合する—を導入して発現を誘導し (図 12)、HAT タグをもつ Msi1 が、m-numb 遺伝子の mRNA に結合するか否かを調べた。上記の手順で導入した細胞に由来する細胞溶解液を、Talon 金属キレート化アフィニティ樹脂 (Clontech) に添加して Msi1-RNA 複合体を精製した。次に、HAT タグをもつ Msi1 タンパク質に結合した RNA をフェノールで抽出し、逆転写後に m-numb 遺伝子または多くの細胞

種で大量に発現する β アクチン遺伝子（内部標準として使用）に特異的なプライマーを用いて PCR で増幅した。HAT タグをもつ Msi1 タンパク質に結合した RNA の逆転写 (RT) -PCR 産物は、m-numb 遺伝子用プライマーを使用時には得られたものの、 β アクチン遺伝子用プライマー使用時には認められなかった（図 13、レーン H [RT (+)]）。Msi1 タンパク質の RNA 結合における必要条件を明らかにするために、RNA 結合に不可欠な 3 つの芳香族アミノ酸を置換した (63F→L、65F→L、68F→L) 変異型 Msi1 タンパク質 FLAG-Msi1mutR1-HAT（図 11）についても、内在性 m-numb の対 RNA 結合能力を調べた。その結果、変異型 Msi1 タンパク質 (FLAG-Msi1mutR1-HAT) では、m-numb の mRNA に対する結合がみられず（図 13、レーン A）、アフィニティ樹脂上に m-numb の RNA が保持されることが、Msi1 タンパク質の RNA 結合能力に必要であることを意味していた。別の対照試験として、HAT アフィニティタグのない Msi1 タンパク質 FLAG-Msi1（図 11）を NIH 3T3 細胞で発現させて同じ結合試験を行ったところ、m-numb の mRNA が樹脂上に保持されていることは検出できなかった（図 13、レーン F）。以上の結果は、Msi1 が内在性の m-numb の RNA と in vivo で結合することを示している。

（４）Msi1 による m-numb 遺伝子の発現抑制（内在性 m-Numb の発現とレポーターアッセイ）

Msi1 タンパク質が内在性 m-Numb タンパク質発現におよぼす作用を調べるために、組換えアデノウイルスベクターを用いて Msi1 を NIH 3T3 細胞で異常に発現させた（図 14 と 15）。NIH 3T3 細胞には、Adex-FLAGMsi1 または Adex-NLlacZ アデノウイルスを細胞に無毒な条件下で感染させた。Adex-FLAGMsi1 ベクターを感染させたところ、サイトメガロウイルス (CMV) -1E エンハンサーと修飾ニワトリ β アクチンプロモーターの融合プロモーターである CAG プロモーターの制御下で高量の FLAG タグをもつ Msi1 タンパク質が発現した。Msi1 発現はチューブリンの発現レベルに影響しなかったことから、チューブリンを内部標準として、m-Numb タンパク質の発現レベルに Msi1 がおよぼす作用を評価した。Msi1 を過剰に

発現させると、内在性 m-Numb タンパク質レベルが Adex-NLlacZ を感染させて LacZ を発現する対照細胞におけるレベルと比べて 32%低下した（図 14 と 15）。しかし、内在性 m-numb 遺伝子の mRNA レベルは、Msi1 と LacZ を異常に発現させても変わらなかった（図 14 と 15）。以上の結果から、Msi1 タンパク質は、m-Numb タンパク質発現の翻訳段階を抑制することがわかる。

次に、Msi1 タンパク質が *in vivo* で標的配列の発現を調節する機構を調べるために、多様なルシフェラーゼ合成遺伝子を含むレポーターアッセイ系を構築した。ホタルのルシフェラーゼレポータープラスミドと Msi1 発現プラスミドを、Msi1 が内在的に発現していない NIH 3T3 細胞に一時的に同時導入した。m-numb 遺伝子の 1.4kb の 3'-UTR 全体とつなげたルシフェラーゼレポーター遺伝子は SV40 プロモーターの制御下においた（図 16）。レポーター遺伝子の発現レベルは、ルシフェラーゼの発光レベルを元に定量した。野生型 msi1 遺伝子とその非 RNA 結合変異体 (msi1mutR1) は、CMV プロモーターの制御下に置いた。図 17 に示すように、ルシフェラーゼの酵素活性レベルは、導入して発現させた野生型 Msi1 の存在下で用量依存的に低下した。これと対照的に、RNA 結合活性を欠く Msi1mutR1 では、ルシフェラーゼ酵素レベルの低下は認められなかった（図 17）。また、レポーター遺伝子に m-numb の 3'-UTR がないものや、m-numb 遺伝子の 3'-UTR と逆向きに結合して Msi1 結合部位を除くと、野生型 Msi1 はルシフェラーゼレポーター活性を低下しなかった（図 17）。したがって、レポーター遺伝子発現の抑制には Msi1 の RNA 結合活性が介在することがわかった。

また Msi1 は、ルシフェラーゼ-m-numb 遺伝子の 3'-UTR キメラレポーター遺伝子の発現を定常状態の RNA レベルで調節するのではなく翻訳段階で抑制するようである。ノーザンブロットによる RNA の定量では、NIH 3T3 における msi1 遺伝子産物レベルの上昇が、レポーター-numb 遺伝子 3'-UTR 融合 mRNA の相対量に影響しないことが各試験から判明している（図 18）。

Msi1 タンパク質による翻訳段階での抑制が起こる可能性をさらに調べるため

に、Msi1 タンパク質の細胞内における局在について、Adex-FLAGMsi1 を感染させた NIH 3T3 細胞の細胞質溶解液を直線型ショ糖密度勾配 (5~30%) で分離することで調べた。各画分の A_{254} を元に、リボソームとリボソームサブユニットをサイズマーカーとして観察した。リボソームサブユニットの分類は、総 RNA を個々の画分から抽出して確認した。Msi1 タンパク質の有無は、抗 FLAG モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットで各画分について判定した。2mM の $MgCl_2$ の存在下で Msi1 タンパク質は、ポリソーム、80S モノソーム、60S リボソームサブユニット、40S リボソームサブユニットに対応する位置に移動した (図 19)。この結果は、Msi1 タンパク質がリボソームと直接的または間接的に結合することを示している。

これらすべてを考えあわせると、m-numb 遺伝子の mRNA が、Msi1 の *in vivo* における標的のひとつであることがわかる。Msi1 は、m-numb 遺伝子の mRNA の 3'-UTR と直接結合して m-Numb タンパク質の発現を翻訳段階で抑制する。

(5) Notch 情報伝達の活性に対する Msi1 の増強作用

Msi1 タンパク質による m-numb 遺伝子の翻訳段階における発現抑制の生物学的意義を調べるために、HES1 プロモーターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。極めて短い HES1 プロモーター配列には、2 か所の RBP-J κ 結合部位があり、Notch 情報伝達の誘導に伴いトランスに活性化される。Msi1 を導入すると、HES1 プロモーター活性が若干上昇した (基底状態から 5.1 倍の活性化) (図 20)。Msi1 によるこのわずかな上方制御は、内在性 Notch の活性化によるものと解釈できる。Notch の優性活性型のひとつである Notch1 の細胞内ドメイン (FCDN1) のトランス活性化が、Msi1 を NIH 3T3 細胞に導入することでどのように変化するかについて検討した。Notch1 の活性化型を単独で発現させると、HES1 プロモーターが基底状態と比べて 24.5 倍活性化した (図 20)。この活性化は、標的となる DNA に対して結合部位をもたず、Notch 情報伝達の活性化を妨げる RBP-J κ 優性抑制型 (R218H、図 20 の DN-RBP-J κ) の発現に伴い阻害される。

また、Notch1 優性活性型とともに Msi1 を導入して発現させると、HES1 プロモーターの活性は、優性活性化型の Notch1 単独で引き起こされる活性化に対してさらに 2.7 倍上昇した（基礎レベルの 66 倍の活性化）（図 20）。Msi1 の発現が HES1 プロモーター活性を、優性活性型の Notch1 の活性と相乗的に高めることを見出した（図 20）。Msi1 による HES1 プロモーターをもつルシフェラーゼレポーター活性の増強は、DN-RBP-J κ を発現させても抑制される（図 20）。したがって、Msi1 による HES1 プロモーターの誘導は、DN-RBP-J κ 依存性経路を介した Notch 情報伝達の活性化によると考えられる。その一方で、Notch1 による HES1 プロモーターのトランス活性化が m-Numb タンパク質の過剰発現によって阻害されることがわかった（図 21）。これらすべてを考えあわせると、NIH 3T3 細胞における Msi1 の異所的過剰発現が、内在性の m-Numb タンパク質レベルを、mRNA レベルに影響することなく低下させること（図 14 と 15）と、m-Numb が NIH 3T3 細胞において Notch 情報伝達の拮抗物質として作用することがわかる（図 21）。したがって Msi1 は、m-Numb を翻訳段階で抑制して RBP-J κ 依存性経路を介して Notch 情報伝達の活性化にかかわっている。

（6）アンチセンス PNA

msi2 asPNA は PE Biosystem 社で常法にて合成、精製したものである。msi2 asPNA の配列は、翻訳開始コドン（5' CTCCATAGCGGAGCC3' -Lys）またはコード領域（5' ACCTAATACTTTATCT3' -Lys）と一致している。PNA（Aldrian-Herrada et al., Nac. Acids. Res. 26(1998):615-621）の自己会合を防ぐためにリジンを 3' 端に添加した。これらの 2 つの asPNAs はニューロスフェア形成に同様の作用を有している。

（7）ニューロスフェアの培養（神経幹細胞の培養）

ニューロスフェア形成および分化アッセイの標準的手法、ならびに EGF 20ng/ml および bFGF 10ng/ml を含む基礎培地の作製は、既述の方法（Nakamura et al. J. Neurosci. 20(2000):283-293）に従った。すなわち、神経幹細胞が自

己複製して生じる 1 次球塊(primary sphere) 形成(細胞 5×10^5 個/5ml/ウェル、6 ウェルプレート) には、E14.5 の終脳の前半部位の細胞を用いた。1 次球塊の細胞を個々の細胞に分離した時点で培地に(図 24) に図示してある量 ($0-10 \mu\text{M}$) の *msi2* asPNA を添加し、2 次球塊形成用プレート(細胞 500 個/200 μl /ウェル、96 ウェルプレート) 上に細胞を移し、培養した。継代の 4 日後に、2 次球塊の数を数えた。*Msi2* の半定量的 RT-PCR および免疫細胞化学的解析に使用する細胞は、20 μM の *msi2* asPNA で 24 時間処理後、採集した。

(8) 半定量的 RT-PCR

msi2 asPNA を添加して、または添加せずに 24 時間インキュベートした細胞を収集した (1.5×10^5 個)。TRIzol 試薬 (Gibco-BRL) を用いて単離した全 RNA は DNaseI (Gibco-BRL) で処理し、第 1 鎖(first-strand) cDNA を SuperScript II 逆転写酵素 (Gibco-BRL) を用いて合成した後、RNase H (Takara) で処理した。PCR 反応は、*msi2* (5' プライマー 5' GTCTGCGAACACAGTAGTGGA3' および 3' プライマー 5' GTAGCCTCTGCCATAGGTTGC3' , 340bp) および *g3pdh* (5' プライマー 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC3' および 3' プライマー 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA3' , 452bp) のプライマーセットを用いて、Extaq DNA ポリメラーゼ (Takara) により、変性 (94℃、45 秒間)、プライマーのアニール (54℃、1 分間)、および DNA 伸長反応 (72℃、2 分間) を 35 または 38 サイクル繰り返した。鋳型 cDNA の量は、内部標準遺伝子として使用した *g3pdh* の量に従って基準化した。連続的に希釈した cDNA サンプルを、*g3pdh* プライマーセットを用いて PCR を 33 サイクル繰り返して増幅した。独立に 3 回調整した細胞サンプルを用いて、上の実験を 3 回繰り返した。PCR 産物を、5%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離し、SYBR Green (Takara) により染色後、FMBIO II マルチビュー (Takara) を用いて可視化を行い、定量した。

CNS 幹細胞の機能に対する *Msi* ファミリーのタンパク質の関与を直接検討するためには、*Musashi1*, *Musashi2* の 2 遺伝子の二重ノックアウトが有意義であると

考えられた。こうした目的のために、msi2 遺伝子に特異的なアンチセンス化合物を、msi1^{-/-}胚または同腹仔から調製した CNS 幹細胞培養に添加し、得られたニューロスフェアの数を測定した。msi2 の翻訳開始領域またはコード領域（16 または 17mer）のアンチセンスオリゴヌクレオチドを PNA として合成した（msi2 asPNA）。PNA は同形のペプチドを骨格とする新しいタイプの DNA 構造類似体であり、このため、標的 DNA および RNA への配列特異性が高く、プロテアーゼおよびヌクレアーゼに対して安定性が高く、さらに細胞毒性が低くなっている。胎仔前脳に由来する培養細胞に msi2 asPNA を投与すると、Msi2 抗体に関する半定量的 RT-PCR 解析および免疫細胞化学的検出により示されたように（図 22、23）、転写産物およびタンパク質の両者のレベルで msi2 発現の特異的かつ著明な低下が生じた。msi1^{-/-}培養細胞において、msi2 asPNA の存在下でニューロスフェア形成アッセイを行ったところ、msi2 asPNA の用量に相関して、ニューロスフェア形成の激しい減少が明らかに認められた（図 24）。これとは反対に、野生型培養細胞では、msi2 asPNA の存在下でも正常にニューロスフェアが形成されたことから、野生型の CNS 幹細胞のニューロスフェア形成能と生存能力は、少なくとも一定濃度の msi2 asPNA の存在下において msi2 単独での抑制には影響されないという知見が確立された。全ての知見を考え合わせれば、Msi1 および Msi2 の両者は、胚 CNS 幹細胞の増殖および／または維持に重要な機能を果たしている。こうした機能は、これらの 2 遺伝子に割り当てられていると考えられる。一方、生後の CNS 幹細胞では、これらの機能は Msi2 よりも、むしろ主として Msi1 によって遂行されるものと考えられる。

産業上の利用可能性

本発明によりムサシ蛋白質の新たな機能が解明された。すなわち、ムサシ蛋白質はニューロン分化調節機を有する Numb タンパク質の発現を抑制し、また Notch 情報伝達系の活性を増強するので各種中枢神経系疾患の治療薬として利用

でき、さらに神経幹細胞の増殖活性増強剤としても利用できる。

請求の範囲

1. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分とする Numb タンパク質発現抑制剤。

2. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分とする Notch 情報伝達活性増強剤。

3. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分とする神経幹細胞増殖活性増強剤。

4. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の有効量を適用することを特徴とする Numb タンパク質の発現抑制方法。

5. 適用対象が、細胞、組織又は動物である請求項4記載の方法。

6. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の有効量を適用することを特徴とする Notch 情報伝達活性の増強方法。

7. 適用対象が、細胞、組織又は動物である請求項6記載の方法。

8. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の有効量を適用することを特徴とする神経幹細胞増殖活性の増強方法。

9. 適用対象が、細胞、組織又は動物である請求項8記載の方法。

10. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の Numb タンパク質発現抑制剤製造のための使用。

11. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の Notch 情報伝達活性増強剤製造のための使用。

12. ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列の1又は複数個が置換、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子の神経幹細胞増殖活性増強剤製造のための使用。

図 1

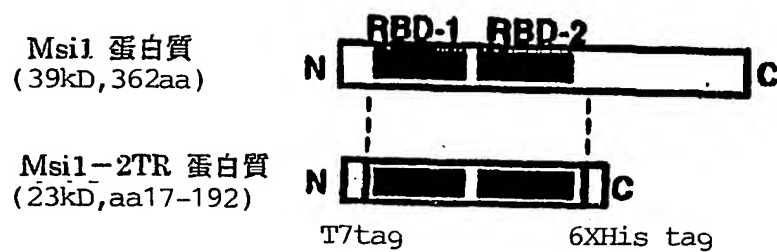


図 2

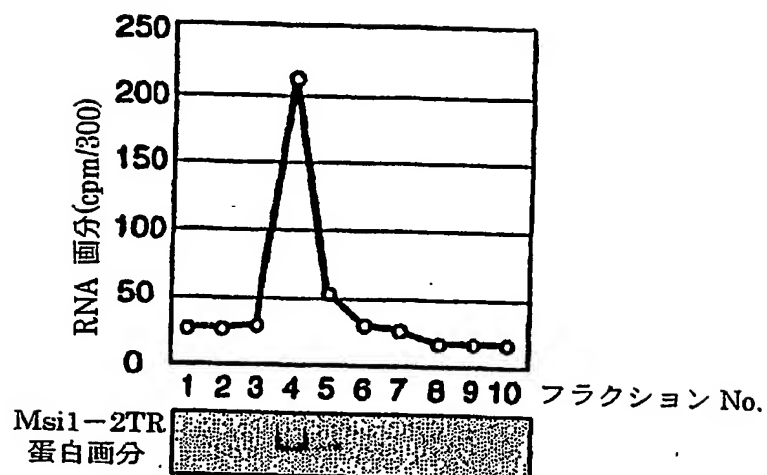
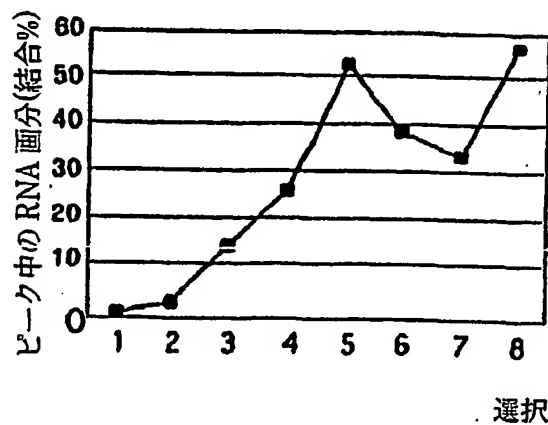


図 3



1-85

58-3

58-4

88-1885

01-10

2000

500

500 500

1
2
3
4
5

58 59

58-1

58-1

85-1

58-2-1

85

85

85

55

85

85

2/11

差替え用紙（規則26）

图 5

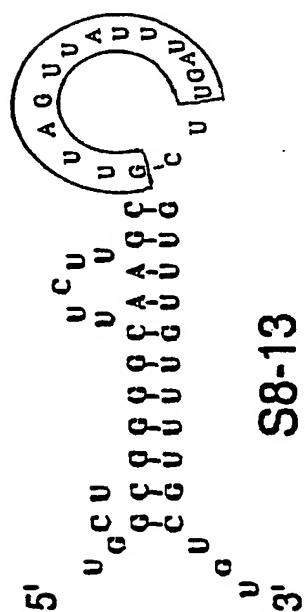
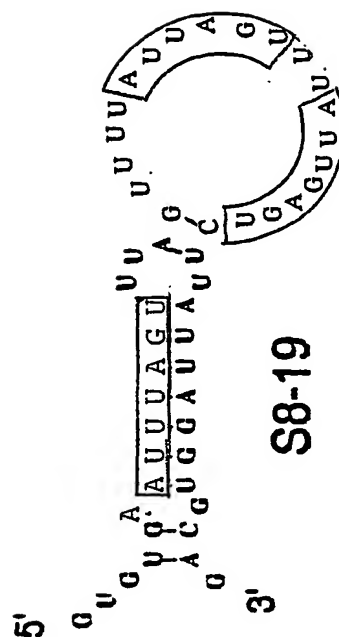


図 6

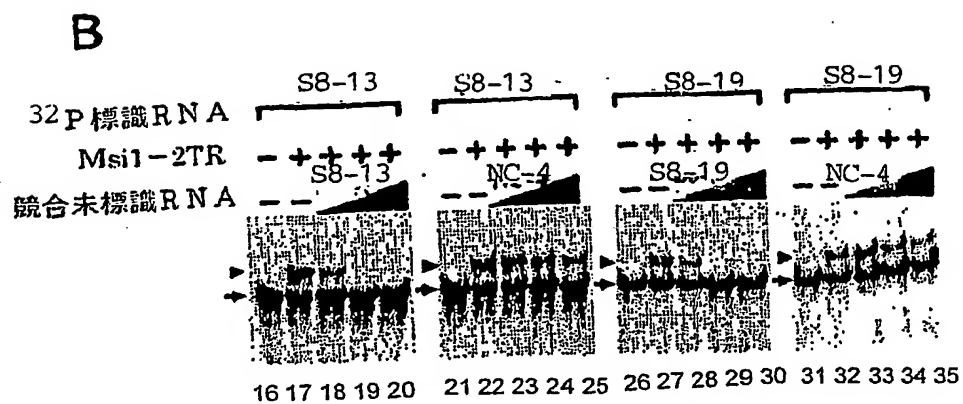
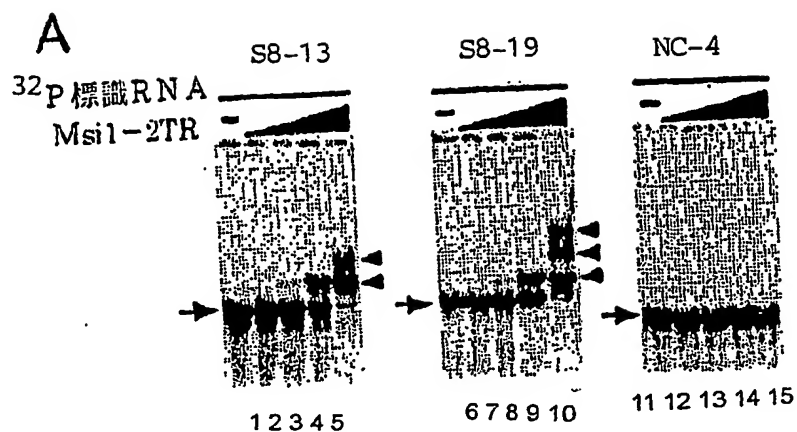


図 7

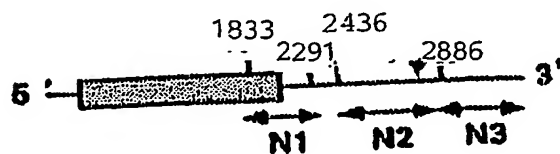


図 8

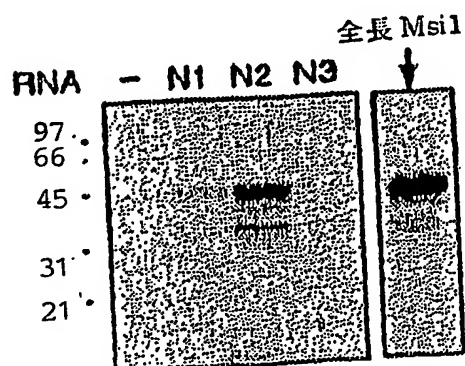


図 9

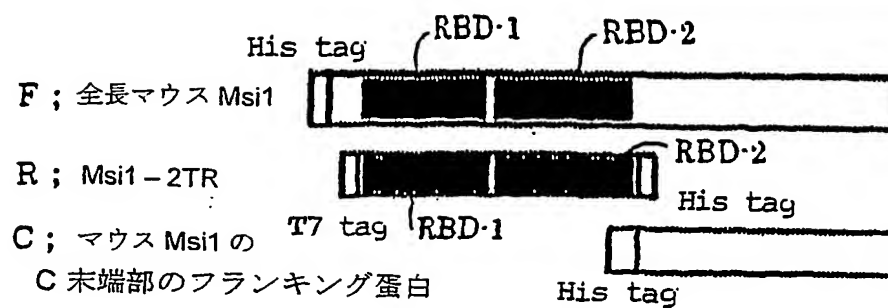


図 10

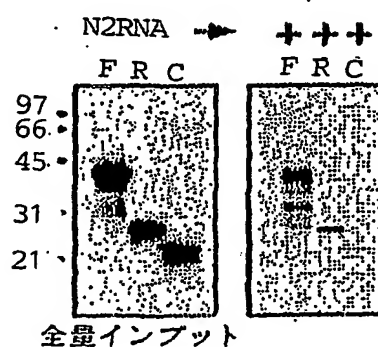


図 11

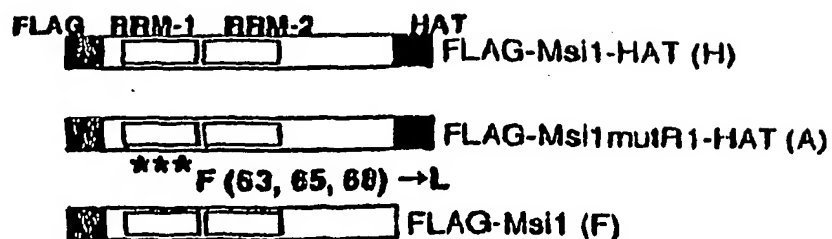


図 12



図 1 3

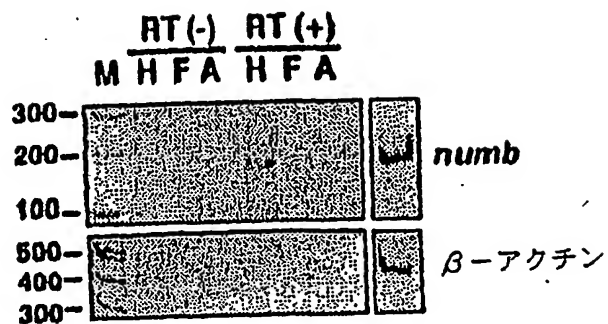


図 1 4

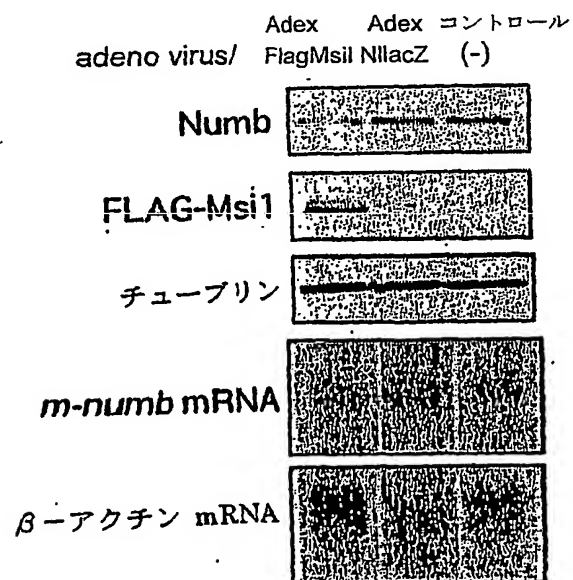


図 1 5 :

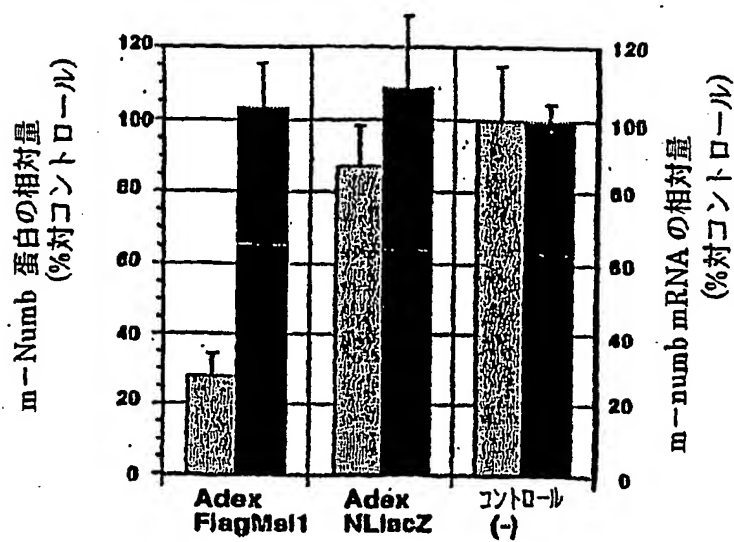
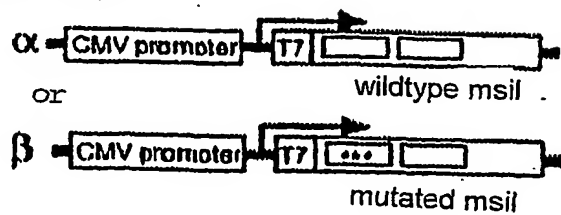


図 1 6

イフェクター



リポーター

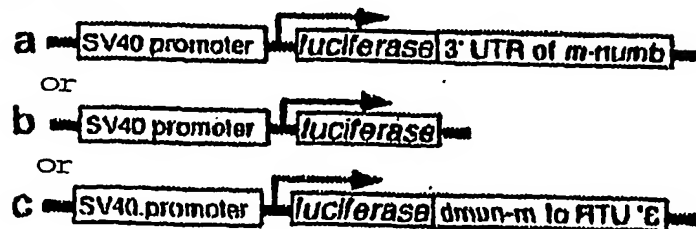


図 1 7

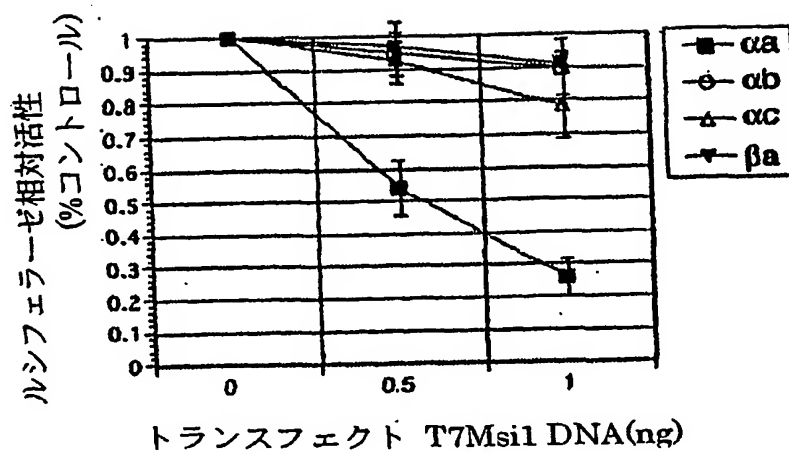


図 1 8

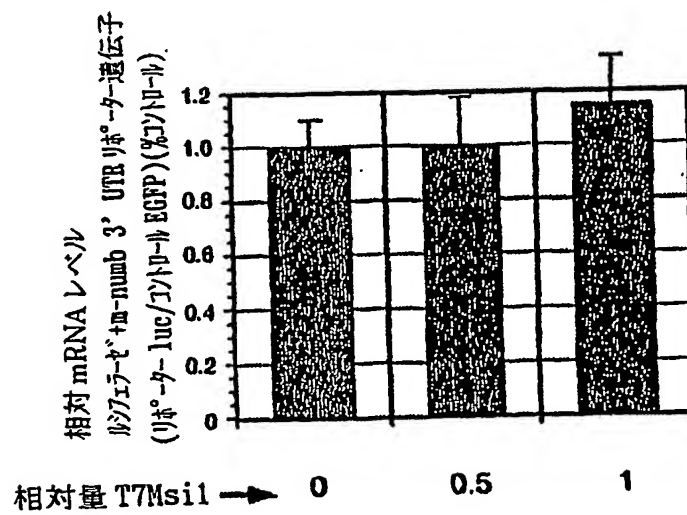


図 19

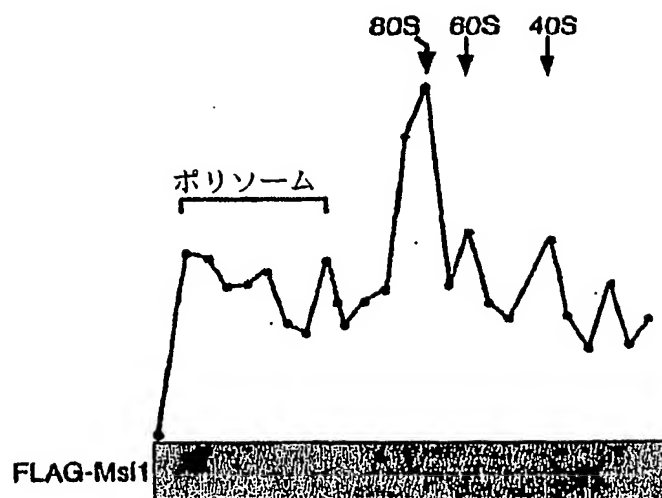


図 20

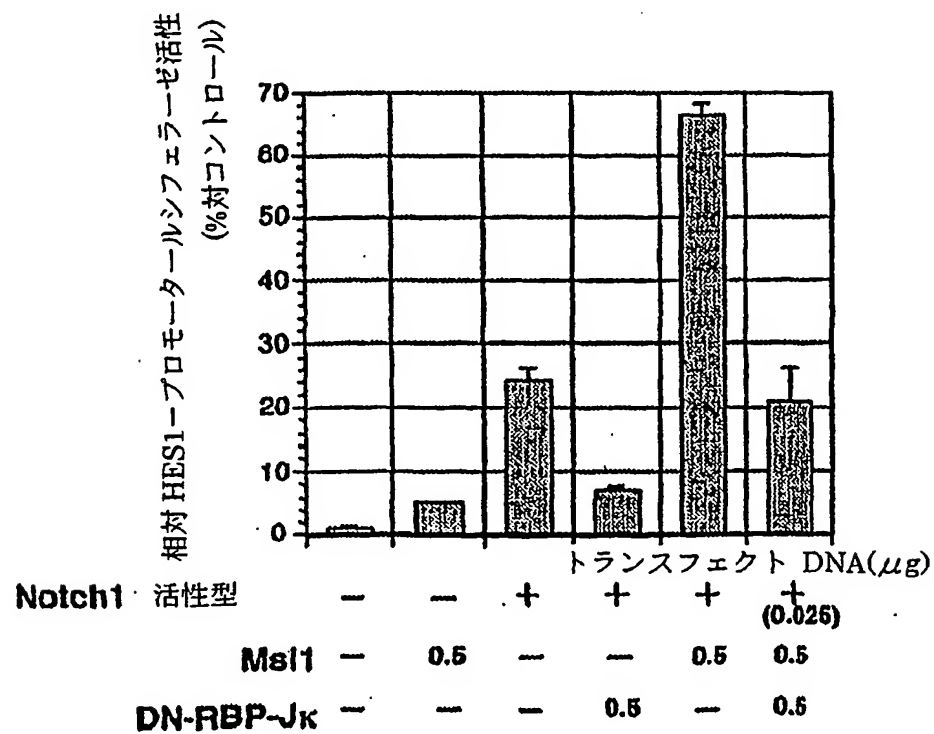


図 2 1

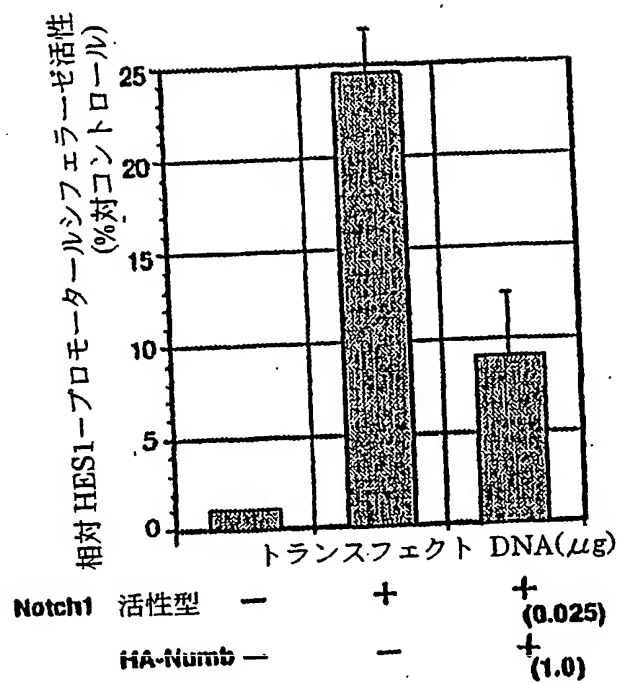


図 2 2

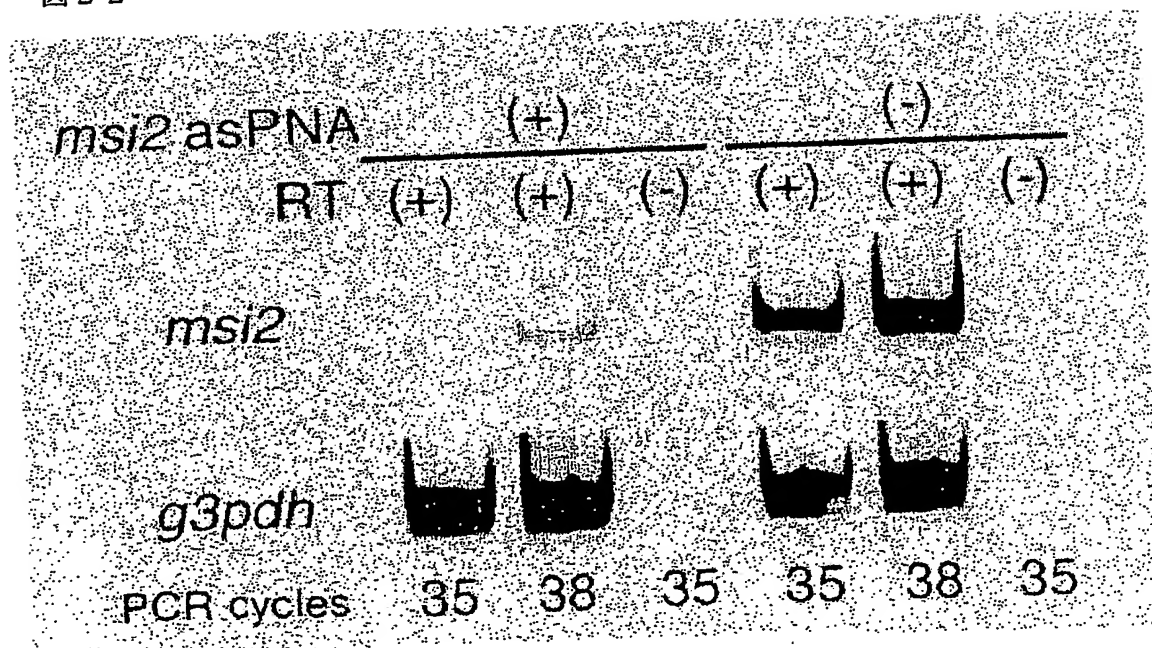


図 2 3

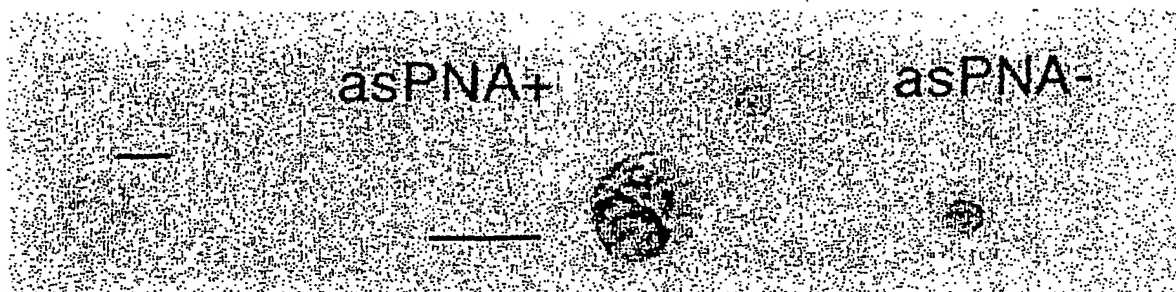
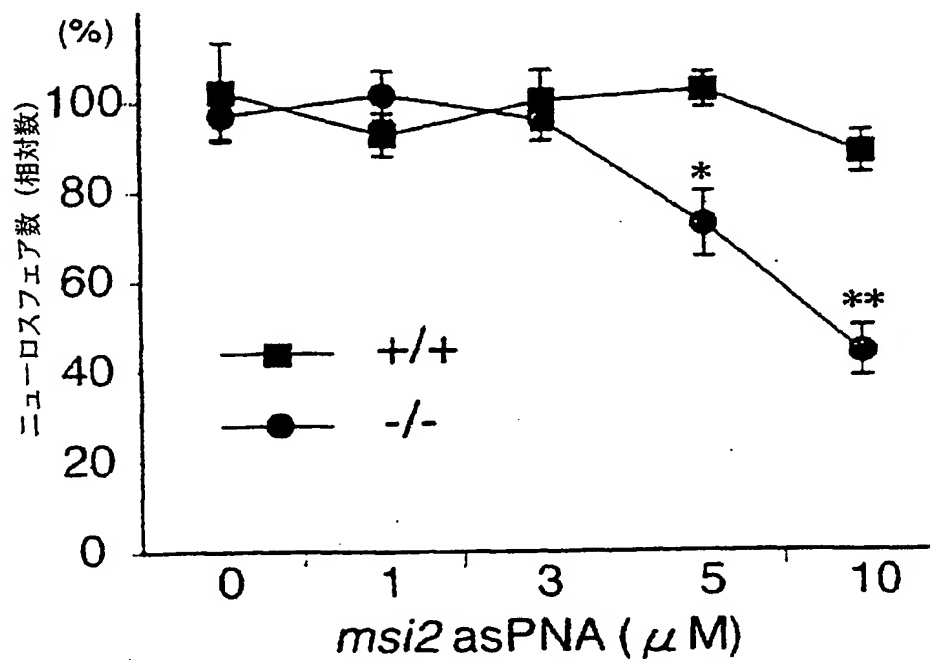


図 2 4



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Expression Inhibitor for Numb Protein

<130> JST0004

<140>

<141>

<150> JP2001-164412

<151> 2001-5-31

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for T7

promoter

<400> 1

cggaattcta atacgactca ctatagggaa gatctcgacc agaag

45

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for T7

promoter

<400> 2

tgaggatcca tgtagacgca cata

24

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for

2/14

m-numb gene

<400> 3

atgagcaagc agtgttgtcc tgg

23

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
m-numb gene

<400> 4

caagtagctg caactggctg g

21

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for

3/14

Beta-actin

<400> 5

cttcctccct ggagaagagc tatgagc

27

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
Beta-actin

<400> 6

gcctagaagc acttgcggig cacg

24

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for

lusiferase gene

<400> 7

gaggtcctat gattatgtcc gg

22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
lusiferase gene

<400> 8

gttgagcaa gatgattcc

20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for

5/14

EGEP gene

<400> 9

cagaagaacg gcatcaagg

19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
EGEP gene

<400> 10

tgctcaggta gtggttgctg

20

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: msi2 asPNA

<400> 11

ctccatagcg gagcc

15

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: msi2 asPNA

<400> 12

acctaatact ttatct

16

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
msi2 gene

<400> 13

gictgcgaac acagtagtgg aa

22

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
msi2 gene

<400> 14

gtagcctctg ccataggttg c

21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
g3pdh gene

<400> 15

accacagtc atgccatcac

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
g3dph gene

<400> 16

tccaccaccc tgttgctgta

20

<210> 17

<211> 1551

<212> DNA

<213> mouse

<220>

<221> CDS

<222> (64).. (1152)

<400> 7

cgccgagcgc cgccgccgcc gccgccgccg ccgctccgct gcccgcgccg cccgcggctc 60

ccg atg gag act gac gcg ccc cag ccc ggc ctc gcc tcc ccg gac tgc 108

Met Glu Thr Asp Ala Pro Gln Pro Gly Leu Ala Ser Pro Asp Ser

1

5

10

15

ccg cac gac ccc tgc aag atg ttc atc gga gga ctc agt tgg cag acc 156

Pro His Asp Pro Cys Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Gln Thr

20

25

30

acg cag gaa ggg ctg cgc gaa tac ttc ggc cag ttc ggg gag gtg aaa 204

Thr Gln Glu Gly Leu Arg Glu Tyr Phe Gly Gln Phe Gly Glu Val Lys

35

40

45

gag tgt ctg gtg atg cgg gac ccc ctg acc aaa aga tcc agg ggt ttc 252

Glu Cys Leu Val Met Arg Asp Pro Leu Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe

50

55

60

ggc ttc gtc act ttc atg gac cag gcg ggg gtg gat aaa gtg ctg gcg 300

Gly Phe Val Thr Phe Met Asp Gln Ala Gly Val Asp Lys Val Leu Ala

65

70

75

caa tgc cgg cac gag ctc gac tcc aaa aca att gac ccc aag gtg gcc 348

Gln Ser Arg His Glu Leu Asp Ser Lys Thr Ile Asp Pro Lys Val Ala

80

85

90

95

ttt cct cga aga gca cag cct aag atg gtc act cgg acg aag aag atc 396
Phe Pro Arg Arg Ala Gln Pro Lys Met Val Thr Arg Thr Lys Lys Ile
100 105 110

ttc gtg ggg ggg ctg tct gtg aac acc acg gtg gaa gat gtg aaa cac 444
Phe Val Gly Gly Leu Ser Val Asn Thr Thr Val Glu Asp Val Lys His
115 120 125

tat ttc gag cag ttc gga aag gtg gat gat gcc atg ctg atg ttc gac 492
Tyr Phe Glu Gln Phe Gly Lys Val Asp Asp Ala Met Leu Met Phe Asp
130 135 140

aaa acc acc aac agg cac aga ggg ttt gga ttt gtc acg ttt gag agc 540
Lys Thr Thr Asn Arg His Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Glu Ser
145 150 155

gag gac atc gta gag aaa gtt tgt gag atc cac ttc cat gaa atc aac 588
Glu Asp Ile Val Glu Lys Val Cys Glu Ile His Phe His Glu Ile Asn
160 165 170 175

aac aaa atg gtg gaa tgc aag aaa gcc cag cca aag gag gtg atg tcc 636
Asn Lys Met Val Glu Cys Lys Lys Ala Gln Pro Lys Glu Val Met Ser
180 185 190

ccg aca ggc tca gcc cgg ggc agg tct cgg gtc atg ccc tac gga atg 684
11/14

Pro Thr Gly Ser Ala Arg Gly Arg Ser Arg Val Met Pro Tyr Gly Met

195

200

205

gat gcc ttc atg ctg ggt att ggg atg ctg ggt tac cca ggg ttc caa 732

Asp Ala Phe Met Leu Gly Ile Gly Met Leu Gly Tyr Pro Gly Phe Gln

210

215

220

gcc acg acc tac gcc agc cgg agt tac aca ggc ctt gcc cct ggt tac 780

Ala Thr Thr Tyr Ala Ser Arg Ser Tyr Thr Gly Leu Ala Pro Gly Tyr

225

230

235

acc tac cag ttc ccc gaa ttc cgt gta gag cgg agc cct ctc ccg agc 828

Thr Tyr Gln Phe Pro Glu Phe Arg Val Glu Arg Ser Pro Leu Pro Ser

240

245

250

255

gcc cca gtc ctc ccc gag ctc aca gct atc cct ctc acg gct tat ggg 876

Ala Pro Val Leu Pro Glu Leu Thr Ala Ile Pro Leu Thr Ala Tyr Gly

260

265

270

ccc atg gcg gcg gca gcg gcg gcg gca gct gta gtt cga ggg aca ggc 924

Pro Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Gly Thr Gly

275

280

285

ict cac ccc tgg acg atg gct ccc cct cca ggt tcc act ccc agc cgc 972

Ser His Pro Trp Thr Met Ala Pro Pro Pro Gly Ser Thr Pro Ser Arg

290

295

300

aca ggg ggc ttc cta ggg acc aca agc ccc ggc ccc atg gct gag ctc 1020

Thr Gly Gly Phe Leu Gly Thr Thr Ser Pro Gly Pro Met Ala Glu Leu

305

310

315

tac ggg gca gcc aac cag gac tcc ggg gtc agc agt tac atc agc gcc 1068

Tyr Gly Ala Ala Asn Gln Asp Ser Gly Val Ser Ser Tyr Ile Ser Ala

320

325

330

335

gcc agc ccc gcc ccc agc act ggt ttc ggc cac agt ctt ggg ggt ccc 1116

Ala Ser Pro Ala Pro Ser Thr Gly Phe Gly His Ser Leu Gly Gly Pro

340

345

350

ttg att gcc aca gcc ttc acc aat ggg tac cac tga aacagggagg 1162

Leu Ile Ala Thr Ala Phe Thr Asn Gly Tyr His

355

360

aggiagcagg agcgccccag cctgcagctg actgaggacc agactgagcc agcaagggga 1222

ttgggacacc tccgccgcag cagcccagcc ccttggctgc cacttggacc gctactgcct 1282

gtccctcaac ccttgggccc agccccctca tctctggctc ccttactaac ctccgttca 1342

gacctgtct ctctctcgc tcccaccigc ctctctccct ggctgctttt attattttt 1402

ggattagcca gttgccctac cccacacca gatctgccct ctctccggt ctgccccatc 1462

ccicccctgct gcccccttta gggcaccccc cccccagaaa ggcatagctg gagggcgggc 1522

agagggggcc tgctgcagac tgaggcccc 1551

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, A61K31/711, A61K38/16, A61K48/00, A61P25/00, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, A61K31/711, A61K38/16, A61K48/00, A61P25/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST (JOIS)
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Imai T. et al., The neural RNA-binding protein Musashi translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its RNA, Molecular and Cellular Biology, June 2001, Vol.21, No.12, pp.3888-3900	1-3,10-12
PX	Takao IMAI, et al., Musashi Idenshi wo mochiita No Saisei Chiryo e no Michi, Molecular Medicine, July 2001, Vol.38, No.8, pp.922-926	1-3,10-12
A	Okabe M. et al., Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division, Nature, 03 May 2001 (03.05.01), Vol.411, pp.94-98	1-3,10-12
A	Hisayuki OKANO, et al., Shinkei Zenku Saibo/Shinkeikan Saibo no Hitaishosei Bunretsu no Seigyo to Saibo Keifu no Keisei, Jikken Igaku, 1998, Vol.16, No.17, pp.2198-2205	1-3,10-12
A	Knoblich A. J. et al., The N terminus of the Drosophila Numb protein directs membrane association and actin-dependent asymmetric localization, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997,	1-3,10-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 February, 2002 (15.02.02)

Date of mailing of the international search report
26 February, 2002 (26.02.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10231

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Vol. 94, pp. 13005-13010	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10231

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Since animals including humans are cited as the subjects of the method of inhibiting the expression of Numb protein, the methods of enhancing the Notch information transfer activity and the method of enhancing the nerve stem cell proliferation activity, the inventions as set forth in claims 4 to 9 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth respectively in claims 1 and 10, claims 2 and 11, and claims 3 and 12 have a technical matter in common of using "a Musashi protein, polypeptides having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of the Musashi protein by substitution, deletion, addition or insertion of one or more amino acids or genes encoding these polypeptides".

However, the Musashi protein and a gene encoding the same are not novel any longer and, therefore, cannot be regarded as a special technical feature, i.e., a technical feature that defines a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art in the meaning as defined in the second sentence in PCT Rule 13.2.

Such being the case, there is no technical relevancy in the meaning as defined in PCT Rule 13.2 between the inventions as set forth respectively in claims 1 and 10, claims 2 and 11, and claims 3 and 12. Therefore, the requirement of unity of invention is not fulfilled.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, A61K31/711, A61K38/16, A61K48/00, A61P25/00, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, A61K31/711, A61K38/16, A61K48/00, A61P25/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST(JOIS)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Imai T. et al., The neural RNA-binding protein Musashi translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its RNA, Molecular and Cellular Biology, 2001 June, Vol. 21, No. 12, p. 3888-3900	1-3, 10-12
P X	今井貴雄他, musashi遺伝子を用いた脳再生治療への道, Molecular Medicine, 2001 July, Vol. 38, No. 8, p. 922-926	1-3, 10-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.02.02

国際調査報告の発送日

26.02.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Okabe M. et al., Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division, Nature, 2001.05.03, Vol.411, p.94-98	1-3, 10-12
A	岡野栄之他, 神経前駆細胞/神経幹細胞の非対称性分裂の制御と細胞系譜の形成, 実験医学, 1998, Vol.16, No.17, p.2198-2205	1-3, 10-12
A	Knoblich A. J. et al., The N terminus of the Drosophila Numb protein directs membrane association and actin-dependent asymmetric localization, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, Vol.94, p.13005-13010	1-3, 10-12

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
Numbタンパク質の発現抑制方法、Notch情報伝達活性の増強方法、及び神経幹細胞増殖活性の増強方法の対象として、人を含む動物が挙げられていることから、請求の範囲4-9に記載された発明は、人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

請求項1と10、2と11、3と12に係るそれぞれの発明に共通の事項は、「ムサシ蛋白質、ムサシ蛋白質のアミノ酸配列のI又は複数個が弛緩、欠失、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子」を利用していることである。

しかしムサシ蛋白質やこれをコードする遺伝子は、既に新規ではないから、これはPCT規則13.2の第2文の意味において、特別な技術的特徴、すなわち各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴でない。

したがって、請求項 1 と 10、2 と 11、3 と 12 に係るそれぞれの発明の間に PCT 規則 13.2 の意味における技術的な関係はなく、発明の単一性の要件は満たされていない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)